



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

②7 EP 0 634 014 B 1

⑩ DE 694 22 339 T 2

⑤1 Int. Cl.⁷:
G 01 N 33/94
C 12 Q 1/37

DE 694 22 339 T 2

- | | |
|--|----------------|
| ②1 Deutsches Aktenzeichen: | 694 22 339.5 |
| ②5 PCT-Aktenzeichen: | PCT/US94/01137 |
| ②6 Europäisches Aktenzeichen: | 94 907 938.8 |
| ②7 PCT-Veröffentlichungs-Nr.: | WO 94/18561 |
| ②8 PCT-Anmeldetag: | 1. 2. 1994 |
| ②7 Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: | 18. 8. 1994 |
| ②7 Erstveröffentlichung durch das EPA: | 18. 1. 1995 |
| ②7 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: | 29. 12. 1999 |
| ④7 Veröffentlichungstag im Patentblatt: | 24. 8. 2000 |

③0 Unionspriorität:

12724 03. 02. 1993 US

⑦3 Patentinhaber:

Psychemedics Corp., Culver City, Calif., US

⑦4 Vertreter:

Meissner, Bolte & Partner, 80538 München

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,
NL, PT, SE

⑦2 Erfinder:

BAUMGARTNER, Werner A., Malibu, CA 90265, US

⑤4 Verfahren zur Nachweis von Marijuana in einer Haar Probe

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 22 339 T 2

694 22 339.5-08

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein verbessertes analytisches Verfahren, das die relativ rasche Lösung von Haar und Analyse
5 des Marihuanaanalyts, der im Haar vorhanden ist, ermöglicht, ohne die Struktur des Analyten zu beeinträchtigen oder gegenüber biologischen Analyt-Proben von Nachteil zu sein. Ein Marihuana-Analyt kann analysiert werden, indem man einen Antikörper zu einer solubilisierten Haarprobe gibt, die
10 Marihuana enthält, und das Ausmaß und die Dauer des Verbrauchs durch ein Individuum bestimmt.

Hintergrund der Erfindung

15 In der Vergangenheit wurden Haaranalyse-Verfahren zur Bestimmung von Spurenmetallen entwickelt, die den Zweck besaßen, Information über den Ernährungsstatus eines Individuums zu erhalten. Eine Einschränkung der Verwendung dieser Verfahren ist die Schwierigkeit, zwischen
20 Spurenmetallen, die in Haaren aus dem Blutstrom abgeschieden wurden, und Metallen, die im Haar durch äußeren Kontakt mit z.B. Wasser und kosmetischen Mitteln, eingebettet wurden, zu unterscheiden. Diese Verfahren sind deshalb in der Medizin nicht geeignet zur Diagnose von Ernährungsproblemen und sind
25 deshalb nicht als ausreichend genau angesehen worden, um den Gehalt bestimmter Metallspuren, die von einem Individuum konsumiert wurden, zu bestimmen.

29.03.00

Diese Probleme mit früheren Haaranalyseverfahren haben verursacht, daß man sich auf Urin- und Blutanalyseverfahren, verließ, um eingenommene Chemikalien, z.B. zum Drogenmißbrauch, von Arzneimitteln und toxischen Chemikalien in einem Individuum zu bestimmen. Von diesen Verfahren ist es ebenfalls bekannt, daß sie insofern von Nachteil sind, als die Dauer und Intensität der Anwendung oder des Ausgesetztseins nicht bestimmt werden kann. Urin- und Blutanalysen können bestenfalls Kurzzeitinformationen liefern, die eingenommene Drogen oder Chemikalien, wie z.B. einen Drogenmißbrauch, betreffen. Zusätzlich bestehen auch Probleme im Hinblick auf die Interpretation solcher Resultate. Die Bestimmung eines niedrigen Gehaltes an eingenommenen Chemikalien im Urin könnte bedeuten, daß das Individuum eine geringe Menge einer Droge oder einer Chemikalie vor kurzem oder eine größere Menge mehrere Tage vorher eingenommen hat. Eine chronische Drogeneinnahme kann deshalb nach diesem Verfahren ohne wiederholtes Testen nicht bestimmt werden.

20

Als Reaktion auf die Probleme zur Bereitstellung einer verlässlichen und genauen Methode, die sowohl die Dauer als auch die Intensität eines Drogenmißbrauchs von Arzneimitteln, toxischen Chemikalien, usw. messen können, wurde von Dr. Werner A. Baumgartner, wie in „Radioimmunoassay of Hair for Determining Opiate Abuse Histories“, J. Nucl. Med. 20:749-752 (1979) beschrieben, bestimmt, daß das Langzeit-Vorhandensein von Drogenmißbrauch erhalten werden kann durch Analyse von Säugertierhaar, da diese Substanzen innerhalb der Säugertierhaare während ihrer Synthese „eingefangen“ werden. In dieser Hinsicht wurde gezeigt, daß Haar wie ein Bandaufnahmegerät wirkt, d.h. eine Stoffvorgeschichte kann durch Einzelanalysen der Haarproben festgestellt werden. Es wurde gefunden, daß Heroin, sobald es im Blutstrom vorhanden ist, ins Haar kommt, wenn dieses synthetisiert wird.

35

In dieser Untersuchung wurde deshalb festgestellt und durch nachfolgende Untersuchungen bestätigt, daß eine Vielzahl von Chemikalien, wie z.B. bei Drogenmißbrauch, Arzneimittel, toxische Chemikalien, usw., die nachfolgend kollektiv als „Analyt“ bezeichnet werden, während seiner Synthese im Haar eingefangen werden und daß diese Substanzen im Haar im wesentlichen während der Lebensdauer des Haares „eingefangen sind“. Dies wurde für das Kopf- und Körperhaar sowie auch für andere keratinisierte Strukturen, wie z.B. Fingernägel, bestätigt. Suzuki et al., Forensic Sci. International 24 (1984) 9-16. Diese eingefangenen Substanzen können aus dem Haar nicht ausgewaschen werden, und werden bei einer vollständigen oder nahezu vollständigen Zerstörung der Haarfasern vollständig entfernt.

Verfahren des Standes der Technik zum Extrahieren eines Analyts vom Haar umfassen das Behandeln des Haares mit heißen methanolischen Lösungen (Baumgartner et al., J. Nucl. Med. 20 (1979) 748) und durch Über-Nacht-Inkubierung von Haar in einem alkalischen oder sauren Medium, D. Valente et al., Clinical Chemistry 1952, Band 27 Nr. 11 (1981). Frühere Methoden umfassen auch die Verwendung eines Mörsers und Pistills, um den eingefangenen Analyt zusammen mit einem Lösungsmittel freizusetzen.

Die Verfahren der Lösungsmittlextraktion leiden jedoch bei der Genauigkeit unter verschiedenen Problemen zur Bestimmung der Gegenwart und Menge eines eingenommenen Analyten. Eines dieser Probleme besteht darin, daß das Lösungsmittlextraktionsverfahren häufig nur eine geringe unbekannte und variable Fraktion des gesamten in der Haarprobe vorhandenen Analyten entfernen. Solche Methoden zeigen auch die Tendenz, daß sie zeitraubend sind und im allgemeinen erhöhte Temperaturen brauchen, die den Analyt

- beschädigen können. Ein anderer Nachteil ist der, daß verschiedene Analyten verschiedene Lösungsmittel zur Extraktion benötigen. Eine Haarprobe, die z.B. Morphin, Phencyclidin („PCP“), Kokain und Marihuana enthält, muß
- 5 hintereinander mit mehreren verschiedenen Lösungsmitteln extrahiert werden, was ein sehr zeitaufwendiges Verfahren darstellt, insbesondere da die Lösungsmittel verdampft werden müssen, bevor die Analyse vorgenommen werden kann.
- 10 Andere Verfahren und Untersuchungen, die auf dem Abbau des Haars und der Haaranalyse beruhen, umfassen:
- O. Suzuki et al. beschreiben in einer Veröffentlichung von Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd. ein Verfahren zur
- 15 Bestimmung von Methamphetamin und Amphetamin in Nägelabfällen oder Haaren in denen die Substanz zuerst mit einer Mischung aus Methanol und Wasser gewaschen wird und dann in Natriumhydroxid gelöst wird, und danach eine Analyse der extrahierten Droge durchgeführt wird.
- 20 A.W. Holmes beschreiben in Textile Research Journal, 706-712, August 1964, den Abbau von menschlichem Haar durch Papain unter Verwendung von Natriumsulfit als Enzymaktivator.
- 25 Annette M. Baumgartner et al. beschreiben in Journal of Nuclear Medicine 10 (1979) 748-752 die Extraktion von Morphin und Heroin aus Haar durch Pulverisieren des Haares mit Mörser und Pistill und nachfolgende Behandlung mit Methanol.
- 30 D. Valente et al. beschreiben in Clinical Chemistry, Band 27, Nr. 11 (1981) das Verfahren von Dr. Baumgartner, d.h. das Behandeln des Haars mit heißem Methanol zur Bewirkung der Extraktion von Drogen aus Drogenmißbrauch sowie das Verfahren

des Autors der Extraktion von Morphin in einem sauren oder einem alkalischen Medium.

A.M. Baumgartner et al. beschreiben in Journal of Forensic
5 Sciences, Seiten 576-81, Juli 1981 die Extraktion von PCP mit
Mörser und Pistill und nachfolgende Behandlung mit Methanol.
Das extrahierte PCP wurde dann mittels RIA analysiert.

Smith et al. beschreiben in Journal of Forensic Sciences 26,
10 Nr. 3, Juli 1981, Seiten 582-586 das Testen des Haars auf die
Gegenwart von Phenobarbital, wobei ein einzelnes Kopfhaar
gewaschen, getrocknet, in eine Länge von 2 mm geschnitten
wurde und dann zu 0,2 mm 0,1 % SDS/Salzlösung zugegeben
wurde, und die Probe mittels Radioimmunoassay untersucht
15 wurde.

W.A. Baumgartner, Black et al. beschreiben in J. Nucl. Med.
23 (1982) 790-892 die Extraktion von Kokain aus Haarproben
durch Rückflußkochen der Haarproben in Ethanol und
20 nachfolgende RIA-Analyse.

Ishiyama et al. beschreiben in Journal of Forensic Sciences,
Nr. 2, April 1983, Seiten 380-385, ein Verfahren, nach dem
Haar aus Methamphetamin-Süchtigen unter Verwendung von 1,5 N
25 Chlorwasserstoffsäure bei einem pH-Wert von 1 bis 2 und
nachfolgende Analyse unter Verwendung eines
Gaschromatographen und von Massenspektroskopie analysiert
wurde.

30 K. Puschel et al. beschreiben in Forensic Science
International 21 (1983) 181-186 das Lösen von Haarproben
durch Einwirkung von Natriumhydroxid und Hitze und
nachfolgende Analyse auf die Gegenwart von Morphin mittels
RIA.

200300

O. Suzuki et al. beschreiben in Journal of Forensic Sciences 29, Nr. 2, April 1984, Seiten 611-617 die Bestimmung von Methamphetamin und Amphetamin in einem einzigen menschlichen Haar durch Gaschromatographie und chemische

- 5 Ionenmassenspektroskopie. Die Haarprobe wurde zuerst in einer Natriumhydroxidlösung gelöst, zu der dann N-Methylbenzylamin zugegeben wurde.

- 10 N.J. Haley et al. beschreiben in Clin. Chem. 31/10, 1598-1600 (1985) die Analyse von Haar auf Nikotin und Cotinin, nach der gewaschene Haarproben in einer Pufferlösung, die Gelatine, Natriumchlorid, Tris und EDTA enthielt, und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt war, gelöst wurde. Die Proben wurden dann mittels Radioimmunoassay analysiert.

- 15 Sramek, Baumgartner et al. beschreiben in A.M.J. Psychiatry 142:8, August 1985 die Analyse von Haarproben aus psychiatrischen Patienten durch Methanolextraktion und Radioimmunoassay.

- 20 Baumgartner et al. beschreiben in Clinical Nuclear Medicine 10, September 1985 die Vorteile der Extraktion von eingefangenen aus Mißbrauch stammenden Drogen aus dem Haar und nachfolgende RIA-Analyse.

- 25 Gill et al. beschreiben in Nature, Band 318, Seite 577 (1985) die Verwendung einer SDS/Proteinase k/Dithiothreitol-Mischung zur Extraktion von DNA aus Vollblut, gesunden Samen, Vaginaflüssigkeit, Haarwurzeln, Blutflecken und Samenflecken.
30 Die Arbeit gibt an, daß „von den Haarstielen keine DNA isoliert werden konnte“.

- Smith et al. beschreiben in J. Forensic Sci. 1986, 31(4), 1269-73 die Bestimmung von Kokain im Schweiß, menstruellen
35 Blutflecken und Haar unter Verwendung von RIA.



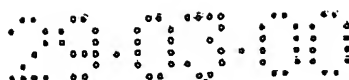
M. Margio et al. beschreiben in „Determination of Morphine and Other Opioids in the Hair of Heroin Addicts by HPLC and MS/MS“ bei der International Conference, University of
5 Verona, Juni 25-26, 1986, verschiedene Methoden zum Assay von Morphin aus Haarproben.

M. Marigo et al. beschreiben in Journal of Analytical Toxicology 10, Juli/August 1986, ein Verfahren zur
10 quantitativen Bestimmung von im Haar von Heroin-Süchtigen enthaltenem Morphin mittels einer Hitze-Säure-Hydrolyse, Pre-Säulen-Dansyl-Derivatisierung, Flüssigphasenchromatographie und Fluoreszenzbestimmung.

15 Smith et al. beschreiben in Journal of Forensic Sciences, Band 31, Nr. 4, Oktober 1986, Seiten 1269-1273 ein Verfahren zur Analyse von Haar in Gegenwart von Drogen, worin Haarproben zuerst gewaschen, dann in kleine Segmente geschnitten, 6 Minuten lang mechanisch pulverisiert, in
20 Ethanol am Rückfluß gekocht werden und die Proben dann unter Verwendung von Radioimmunoassay analysiert werden.

M. Michalodinitrakis, Med. Sci. Law (1987) Band 27, Nr. 1, beschreibt die Bestimmung von Kokain in Ratten durch Analyse
25 von Haarproben, die durch Einwirkenlassen von 1,5 N HCl, deren pH-Wert auf 1 bis 2 eingestellt wurde, gelöst wurden, und nachfolgende Inkubation mit 0,01 HCl bei 37 °C während 1 Stunde.

30 Pelli et al. beschreiben in Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Band 14 (1987) 63-68 ein Verfahren zur Identifizierung von Morphin in Haar von Heroin-Süchtigen, in denen das Haar mit Diethylether und Chlorwasserstoffsäure behandelt und das trockene Extrakt dann in Methanol gelöst
35 wird.



Higuchi et al. beschreiben in Nature, Band 332, Seite 542 (1988) ein Verfahren zum Lösen von Haar bei einem pH-Wert von 8 durch Einwirkung von Dithiothreitol, Proteinase K und 2 % Natriumdodecylsulfat, um DNA aus dem Aufschluß durch eine komplexe chemische Extraktionsmethode zu extrahieren.

Es werden auch bestimmte Patente angegeben, z.B. die US-Patente 3986926, 3966551, 3939040 und 3623950, die sich auf enthaarende Mittel zur Gerbung von Fällen beziehen, und die Verwendung bestimmter Enzyme, einschließlich von Papain, im Enthaarungsverfahren beschreiben.

Diese und andere Verfahren des Standes der Technik haben sich jedoch aus den vorstehend genannten Gründen, oder weil sie die Analyt-Sonden, z.B. Antikörper, der biologischen analytischen Methoden abbauen, und dadurch die Verwendung von solchen hochempfindlichen analytischen Verfahren verhindern, als nachteilig erwiesen.

20

Es besteht deshalb ein Bedürfnis für ein Verfahren zur Analytbestimmung, mit dem rasch und vollständig ein bestimmter Analyt aus Haar von einem Individuum gelöst werden kann, und das eine direkte Analyse der Identität des Analyten und der Dauer der Anwendung des Analyten in, oder das Ausgesetztsein gegenüber einem Individuum erlaubt, ohne den zu interessierenden Analyten zu zerstören und/oder eine Analyt-Sonde für ein biologisch analytisches Verfahren.

Die EP-A-0458594 beschreibt ein Verfahren zur direkten Analyse eines Analyten in keratinisierten Strukturen, das die Herstellung einer Mischung umfaßt, die eine Verbindung mit niedrigem Redoxpotential, wie z.B. Dithiothreitol oder Dithioerythritol, ein Enzym, das zum Abbau der Keratinstruktur geeignet ist, enthält, wodurch es dem Enzym

möglich wird, die Probe der Keratinstruktur zumindest teilweise abzubauen und die Mischung einer Analyse zu unterwerfen, um die Identität und Menge des Analyten zu bestimmen.

5

Die CA-A-2092917 beschreibt ein ähnliches Verfahren, bei dem die aufschließende Mischung ein biologisches Detergens enthält, das den Aufschluß der keratinisierten Struktur bei einem relativ niedrigen pH-Wert unterstützt.

10

Zusammenfassung der Erfindung

Aufgabenstellung der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Bestimmung einer Droge und einer Chemikalie;

15

eine andere Aufgabenstellung der Erfindung ist die Bereitstellung eines Haaranalyseverfahrens für eine Droge und eine Chemikalie;

20

eine weitere Aufgabenstellung der Erfindung ist die Bereitstellung eines zuverlässigen Verfahrens zum Lösen und Analysieren eines Marihuana-Analyts, der in Kopf- und Körperhaar vorhanden ist, und, wenn möglich, zur Bestimmung der Dauer und des Ausmaßes der Einwirkung von Marihuana in

25

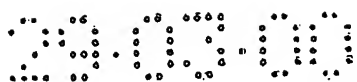
einem Individuum;

eine weitere Aufgabenstellung der Erfindung ist die Bereitstellung einer Haaranalysemethode, die einen Marihuana-Analyt aus dem inneren Kern des Haares löst, ohne den

30

Analyten zu beschädigen;

eine weitere Aufgabenstellung der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung einer zuverlässigen Haar-Auflösungsmethode und direkten Marihuana-Bestimmungsmethode, die die Verwendung



10

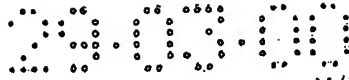
von hochgenauen Immunoassays, wie z.B. Radioimmunoassay, ermöglicht;

eine weitere erfindungsgemäße Aufgabenstellung ist die
5 Bereitstellung eines zuverlässigen Haaranalyseverfahrens, das
in einem wesentlichen kürzeren Zeitraum als bekannte
Haaranalyseverfahren durchgeführt werden kann.

Eine weitere Aufgabenstellung der vorliegenden Erfindung ist
10 die Bereitstellung eines Verfahrens zur Entfernung einer
störenden kreuzreagierenden Substanz aus einer Haarprobe, die
zu falsch-positiven Ergebnissen im Marihuana-Assay führen
könnte.

15 Diese und andere Aufgabenstellungen werden durch das neue
Analysenverfahren nach den Ansprüchen 1 und 2 erzielt, die
die Herstellung einer Mischung umfassen, die Dithiothreitol
(DTT) oder Dithioerythritol (DTE), ein Enzym, das zur
Auflösung des Haars geeignet ist, und eine Haarprobe
20 umfassen, wobei DTT oder DTE das Haar und/oder das Enzym
aktivieren können; das Enzym mindestens einen wesentlichen
Teil der Probe des Haares unter Bildung einer
Haaraufschlußlösung lösen kann; und ein Teil der
Haaraufschlußlösung einer Analyse unterworfen wird, um die
25 Identität und Menge des Analyten, wenn er vorhanden ist, im
Haar zu bestimmen.

Das Enzym kann eine Protease sein, und ist vorzugsweise
Papain, Chymopapain oder Proteinase K. Um das Verfahren zu
30 beschleunigen, können Kupfer, z.B. in Form von Kupfer (III)-
sulfat, oder Natriumarsenit (Na_2AsO_2) zur Aufschlußlösung
zugegeben werden, um überschüssiges Dithioerythritol oder
Dithioerythritol in der Mischung zu deaktivieren, das mit
verschiedenen Komponenten der Mischung in störende
35 Wechselwirkung treten könnte. Vorzugsweise wird die Analyse

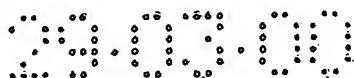


des gelösten Analyts mittels einer biologischen analytischen Methode, wie z.B. einem Immunoassay, z.B. Radioimmunoassay, durchgeführt.

5 Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren bereitgestellt, das die rasche und vollständige Lösung von Marihuana-Analyt aus Kopf- oder Körperhaar eines Individuums, das vorher dem Analyt
10 ausgesetzt war, z.B. den Analyt aufgenommen hat, möglich, und nachfolgende Identifizierung des Analyts durch hochempfindliche Immunoassays. Die Lösung des Analyts aus dem Inneren des Haars wird ohne Beschädigung des in der organischen Matrix der Haarfasern eingeschlossenen Analyts,
15 der analysiert werden soll, durchgeführt, und beeinträchtigt außerdem auch nicht eine nachfolgend verwendete Sonde (z.B. einen Antikörper) einer biologisch analytischen Methode. Die erfindungsgemäße Haaranalysemethode ermöglicht auch die Bestimmung von vorausgegangenen Einnahmegewohnheiten in einem
20 Individuum während längerer Zeiträume ohne Durchführung wiederholter Tests, die bei konventionellen Analyt-Bestimmungsmethoden, die den Gehalt des Analyts in Blut- oder Urinproben messen, notwendig zu machen.

25 Insbesondere umfaßt die Erfindung den raschen enzymatischen Aufschluß des Proteins von Haarproben, und nachfolgende effektive Deaktivierung des Enzyms und eines assoziierten Enzym/Substrat-Aktivators (DTT und DTE). Der resultierte solubilisierete Analyt in der Haaraufschlußlösung wird dann
30 durch hochsensitive Immunoassays analysiert. Es wurde gefunden, daß die Menge des im Haar eingeschlossenen Analyten direkt proportional ist zur Menge des aufgeschlossenen Analyten.



Erfindungsgemäß wird eine Haarprobe zuerst einem Individuum, das in Verdacht steht, einem bestimmten Analyten ausgesetzt gewesen zu sein oder ihn eingenommen hat. Vorzugsweise wird die Haarprobe zuerst nach bekannten Methoden zur Entfernung von Analyten oder anderen Drogen oder Chemikalien, die sich an der Oberfläche des Haars durch äußeren Kontakt, und nicht durch eine tatsächliche Einnahme, abgelagert haben könnte, gewaschen. Diese Haarprobe wird dann einer Behandlung mit bestimmten Enzymen zusammen mit einem bestimmten

10 Enzym/Substrat-Aktivator unterworfen, um den vollständigen oder nahezu vollständigen Aufschluß der organischen Matrix der Haarfaser, d.h. von Keratin, zu bewirken. Der zu untersuchende Analyt, der in der organischen Matrix des Haars „eingefangen war“ wird dann in die Lösung freigesetzt, oder,

15 wenn er an Protein gebunden ist, ist der Analyt sogar für den Antikörper, der in den analytischen Methoden auf Proteinbasis verwendet wird, zugänglich. Um das erfindungsgemäße Verfahren vollständig und genau durchzuführen, ist ein vollständiger Aufschluß der keratinisierten Struktur zweckmäßig.

20

Zum Aufschluß der Haarproben sind Proteasen bevorzugt. Am meisten aktiv, und deshalb zur erfindungsgemäßen Verwendung bevorzugt, sind die Enzyme Papain, Chymopapain und Proteinase K.

25

Es wurde gefunden, daß eine Anzahl anderer Proteasen im erfindungsgemäßen Verfahren bei niedrigen pH-Werten (z.B. pH = 7 bis 9) wirksam sind, nämlich Protease Typ IV (bakteriell, aus *Streptomyces caespitosus*), Typ VIII (aus *Bacillus*

30 *Subtilis*), Typ XI (Proteinase K, pilzartig, aus *Tritirachium album*), Typ XIV (Pronase, aus *Streptomyces griseus*), Typ XVI (aus *Bacillus subtilis*), Typ XVIII (Newlase, aus *Rhizopus species*), Typ XIX (aus *Apergillus sojæ*), Typ XXI (aus *Streptomyces griseus*), Typ XXIV (bakteriell), Typ XXVII

35 (Nagarase), Typ III (Prolase) und Typ XXIII (aus *Aspergillus*

29.03.00

MEISSNER, BOLTE & PARTNER

M/BWT-062-EP/DE

13

Oryzae) (alle sind von Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) erhältlich.

Wie vorstehend angegeben, sehen bestimmte Verfahren des
5 Standes der Technik die Verwendung von Papain zur
Haarentfernung von. Diese Enthaarungsverfahren entfernen das
Haar von Fellen und Haut indem sie es ausreichend weich
machen, wodurch eine leichte Entfernung durch Abschaben oder
andere mechanische Mittel möglich wird, und Verwenden billige
10 und wenig effektive Sulfidryl-Enzym- und Substrataktivatoren,
wie z.B. Thioglykolsäure oder Cystein. Diese Verfahren bauen
das Haar nur teilweise ab und führen zu keinem vollständigen
chemischen Aufschluß des Haares. Ein bloßes Weichmachen des
Haares führt nicht zu einem vollständigen oder nahezu
15 vollständigem Aufschluß des Haares, der notwendig ist, um
eine vollständige Freisetzung des „eingeschlossenen“ Analyten
zu erhalten. Darüberhinaus sind die Sulfidryl-Enzym-
Aktivatoren, die in diesem Enthaarungsverfahren verwendet
werden, auch gegenüber bestimmten biologischen Analyt-Sonden,
20 wie z.B. Antikörpern, schädlich.

Im Gegensatz zu diesen Enthaarungsverfahren verwendet das
erfindungsgemäße Verfahren Dithiothreitol („DTT“ oder 2,3-
Dihydroxbutan-1,4-dithiol) oder sein Isomer Dithioerythritol
25 („DTE“ oder 2,3-Dihydroxybutan-1,4-dithiol) als Substrat und
Enzymaktivator. Überraschenderweise wurde gefunden, daß DTT
und DTE ein hochaktives Enzym produzieren, das zum Aufschluß
von Haar innerhalb einer kurzen Zeit, z.B. von ca. 3 Stunden,
die zur Freisetzung des Analyten in die Haaraufschlußlösung
30 fähig sind. Diese hohe Aktivität des Enzyms wurde zumindest
teilweise aufgrund der Tatsache angenommen, daß die
Aktivierung der keratinisierten Struktursubstanz selbst durch
DTT und DTE, und vermutlich durch die Wirkung von DTT und DTE
bei der Spaltung von Disulfidbindungen in der keratinisierten

29.03.00

Struktur, verantwortlich sind, die den enzymatischen Angriff erleichtern.

Sobald das Protein der keratinisierten Struktur vollständig
5 oder zumindest teilweise aufgeschlossen ist, wodurch der
Analyt in die Lösungsmischung freigesetzt wird, wurde
gefunden, daß es notwendig wird, das Enzym und die
Enzym/Substrat-Aktivatoren zu deaktivieren um den Analyt
biologischen analytischen Sonden, wie z.B. Antikörpern,
10 auszusetzen, da das Enzym und die Enzym/Substrat-Aktivatoren,
wie vorstehend angegeben, die strukturelle Integrität der
Proteinsubstanzen, die an dem analytischen Verfahren
beteiligt sind, störend beeinflussen können. Die Aufgabe der
Deaktivierung der Sulfhydryl-abhängenden Enzyme, wie z.B. von
15 Papain, hat sich als schwierig erwiesen, da nach der
Haaraufschlußstufe die Enzyme in einem „See“ von
Sulfhydrylgruppen, die zu den freigesetzten Haarproteinen und
Enzym/Substrat-Aktivierungsmitteln gehören, „begraben“
werden. Bekannte Sulfhydryl-Blockierungsmittel sind zur
20 Deaktivierung der Enzyme nicht wirksam, weil die bekannten
Sulfidrylblocker die Tendenz zeigen, an den abgebauten
Haarproteinen und DTT oder DTE anzubinden, und nicht
notwendigerweise an die Enzym-Sulfidrylstellen, die zur
Blockierung der Aktivierung der Enzyme kritisch sind. Es ist
25 deshalb nicht möglich, die Immunoassay wirksam zu verwenden,
wenn die Enzym-Sulfhydrylstellen noch aktiv sind.

Überraschenderweise wurde deshalb festgestellt, daß DTT und
DTE nicht nur wirken um die Enzyme zu aktivieren und/oder
30 bewirken, daß das Haar überraschenderweise eine hohe
Haarauflösungsaktivität zeigt, sondern daß sie auch wirken
können, um das Enzym durch eine direkte oder indirekte
(Enzym-Selbstdeaktivierung) durch einen direkten oder
indirekten (Enzym Selbstdeaktivierung)-Mechanismus zu
35 deaktivieren, nachdem das Enzym den vollständigen oder nahezu

vollständigen Aufschluß des Haarproteins bewirkt.

Typischerweise tritt die Enzymdeaktivierung innerhalb von ca. 4 bis 5 Stunden nach Einwirkung des DTT oder DTE auf das Enzym ein, was eine für das Enzym ausreichende Zeit ist, um den Aufschluß der Haarprobe zu bewirken. Sobald das Enzym deaktiviert wurde, wurde gefunden, daß das Enzym durch Einwirkung von frischem DTT oder DTE nicht mehr reaktiviert oder regeneriert werden kann.

- 10 Die Deaktivierung von mindestens einigen der nicht-Sulphydryl-abhängigen Proteasen, z.B. Proteinase K, durch seinen Inhibitor, Phenylmethylsulfonylchlorid, ist im allgemeinen nicht erforderlich, da gefunden wurde, daß das Enzym gegenüber den Antikörpern, die in den Immunoassay-Verfahren auf Proteinbasis verwendet werden, nicht aktiv ist.

Es wurde außerdem gefunden, daß aktives DTT und DTE, die in der Haaraufschlußlösung vorhanden sind, eine Gefahr für die Struktur und Aktivität anderer Proteine, denen es ausgesetzt ist, darstellt, z.B. Antikörper, die in einem Radioimmunoassay verwendet werden.

Es war deshalb ebenfalls ein überraschendes Ergebnis, daß DTT oder DTE in die Reaktionsmischung nicht nur wirken, indem sie das Enzym deaktivieren, sondern in der Aufschlußlösung ohne Einführung eines Inhibitors selbst deaktiviert werden. Typischerweise tritt die spontane Deaktivierung von DTT oder DTE auf, nachdem die Haarprobe aufgeschlossen wurde, aber weniger als ca. 14 Stunden nach der ersten Einwirkung des Enzyms, was von den verschiedenen Konzentrationen und Mengen des verwendeten Enzyms und DTT oder DTE, dem pH-Wert, der Temperatur, der Menge der Haarprobe, usw., abhängt.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann ein vollständiger Haaraufschluß deshalb in einem relativ kurzen Zeitraum

29.03.00

durchgeführt wurden, z.B. über Nacht, und die Haaraufschlußlösung, die den freigesetzten interessierenden Analyten enthält, kann direkt, wirksam und genau am nächsten Morgen einem Immunoassay unterworfen werden. Die gesamte
5 Methode vom Waschen der Haarprobe bis zur Identifizierung des Analyten sollte typischerweise nicht länger als ca. 16 bis 20 Stunden dauern. Es ist nur eine geringe oder keine Einwirkung durch ein individuelles Durchführen des Verfahrens erforderlich, um den Analyten von der Haarprobe freizusetzen,
10 sobald das Enzym und DTT oder DTE in Kontakt mit der Haarprobe kommen.

Alternativ wurde festgestellt, daß die Zugabe von Kupfer, vorzugsweise in Form von Kupfer(III)-sulfat oder anderen
15 ähnlichen Verbindungen, die Kupferionen in Lösung erzeugen, zur Sulfhydrylgruppen-reichen Haaraufschlußlösung so wirken, daß sie die Sulfhydrylgruppen von DTT oder DTE rascher deaktivieren. Der Zusatz geringer Mengen von Kupfer(III)-sulfat zur Haaraufschlußmischung nach Aufschluß der Haarprobe
20 und die Deaktivierung des Enzyms durch DTT oder DTE verkürzt deshalb die Zeit, in der die Haaraufschlußmischung der Immunoassaymethode unterworfen werden kann, beträchtlich, da es nicht notwendig ist, auf die Deaktivierung von DTT oder DTE zu warten, die typischerweise nach weniger als ca. 14
25 Stunden nach ihrer Zugabe zur Aufschlußlösung auftritt. Typischerweise werden ca. 100 µl Kupfer(III)-sulfat (10 mg/ml) zu 1 ml Haaraufschlußlösung ca. 4 bis 5 Stunden nach in-Kontakt-Bringen des Enzyms und (DTT oder DTE) mit der Haarprobe zugegeben, um dem Enzym ausreichende Zeit zu geben,
30 die Haarprobe zu lösen.

Auf ähnliche Weise kann Natriumarsenit (NaAsO_2) erfindungsgemäß verwendet werden, um restliches DTT oder DTE durch Bildung eines Niederschlags zu entfernen.
35 Typischerweise werden 100 ml einer 100 mg/ml Lösung von

29.03.00

MEISSNER, BOLTE & PARTNER

M/BWT-062-EP/DE

17

Natriumarsenit zu 1 ml Haaraufschlußlösung zugegeben, um die Deaktivierung von DTT und DTE zu bewirken.

Sobald die rasche und wirksame Auflösung des Haars zum Zwecke
5 der Freisetzung des eingefangenen Analyten wie vorstehend
beschrieben bewirkt ist, wird die Analytmischung dann einer
Behandlung mit einem Ionenaustauscherharz und einer Analyse
mittels Immunoassay, z.B. Radioimmunoassay („RIA“)
unterworfen. Solche Verfahren sind zur Verwendung in der
10 vorliegenden Erfindung bevorzugt, weil RIA und ähnliche
Immunoassays zur Zeit die einzigen bekannten Masse-
produzierende Verfahren sind, die die erforderliche
Empfindlichkeit und Eignung zur Messung der geringen
Konzentrationen der in den Haarproben enthaltenen Analyten
15 besitzen. Die Verwendung dieser Verfahren ist bevorzugt, weil
nur ca. 0,5 bis 1,0 mg Haar notwendig sind, um die Analyse
durch RIA und andere Immunoassays durchzuführen. Für einen
bestimmten Drogenmißbrauch wurde tatsächlich gefunden, daß
die Analyse nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wirksam
20 durchgeführt werden kann mit einer so geringen Menge wie
einem oder zwei Haaren mit einer Länge von ca. 1 Inch.

Anstelle der analytischen Verfahren auf Proteinbasis können
auch andere analytische Methoden verwendet werden,
25 einschließlich instrumentellen Methoden, wie z.B.
Chromatographie, Massenspektrometrie, usw. Weil diese
Verfahren nicht auf der Basis von Protein arbeiten, sind die
Stufen der Deaktivierung des Enzyms und von DTT oder DTE
nicht notwendig, wenn analytische Verfahren auf nicht-
30 Proteinbasis verwendet werden. Die Geschwindigkeit und die
schonende Behandlung des erfindungsgemäßen
Extraktionsverfahrens und die Fähigkeit, die
Extraktionseffizienz durch Einschluß eines „Tracers“, d.h.
des Einschlußes einer bekannten Menge eines Analyten, macht
35 die hier beschriebene Aufschlußmethode auch für

200300

instrumentelle Analysenverfahren, wie z.B. Gaschromatographie und Massenspektrometrie, zur Methode der Wahl.

- Das erfindungsgemäße Verfahren hat sich als wirksam zur
- 5 Bestimmung der Einnahme und früheren Einnahme von Marihuana herausgestellt.

- Bei der Durchführung des Verfahrens ist es bevorzugt, daß eine wässrige Lösung von ca. 110 mg DTT oder DTE/10 ml
- 10 Wasser verwendet wird, obwohl Konzentrationen von DTT oder DTE von ca. 50 bis 200mg/10 ml Wasser im Verfahren wirksam sind. Bevorzugt ist es, daß das Gewichtsverhältnis von DTT oder DTE zu Papain oder Chymopapain ca. 110:2 beträgt [wenn die Enzymreinheit 16 bis 40 BAEE Einheiten/mg Protein ist],
- 15 obwohl wirksame Ergebnisse auch bei Gewichtsverhältnissen von DTT oder DTE zu Papain oder Chymopapain in Bereich von 110:1 bis ca. 110:4 beobachtet wurden. Im Hinblick auf Proteinase K und andere Proteasen ist es bevorzugt, daß das Gewichtsverhältnis von DTT oder DTE zu Proteinase K (oder
- 20 anderen Proteasen) ca. 1200:1 ist (wenn die Enzymreinheit 10 bis 20 Einheiten pro mg Protein beträgt), obwohl Gewichtsverhältnisse von 1200:0,5 bis ca. 1200:2 ebenfalls wirksam sind.

- 25 Die Konzentration an Haarprotein wird vorzugsweise bei ca. 10 mg Haar/ml Aufschlußlösung gehalten, um variable Matrixeffekte in einem nachfolgend verwendeten Immunoassay zu verhindern.

- 30 Bevorzugt ist es, daß der erfindungsgemäße enzymatische Aufschluß des Haars bei niedrigen Temperaturen und nahe am neutralen pH-Wert durchgeführt wird. In dieser Hinsicht ist es bevorzugt, das Verfahren durchzuführen, wenn Papain, Chymopapain oder andere Sulfhydryl-abhängige Enzyme bei einer
- 35 Temperatur zwischen ca. 20 °C und 40 °C als Enzym verwendet

29.03.00

MEISSNER, BOLTE & PARTNER

M/BWT-062-EP/DE

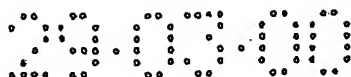
19

werden, und bei einem pH-Wert zwischen ca. pH = 8,8 und 10,5. Vorzugsweise liegt der pH-Wert des Verfahrens zwischen ca. 8,8 und 9,5. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform beträgt die Temperatur ca. 37 °C, und der pH-Wert ca. 9,1.

5

Wenn die Proteinase K oder andere Proteasen als Enzym verwendet werden, ist es bevorzugt, das Verfahren zwischen ca. 20 und 40 °C und bei einem pH-Wert zwischen ca. 7 und 9 durchzuführen. In der besonders bevorzugten Ausführungsform beträgt die Temperatur ca. 37 °C und der pH-Wert ca. 7,0; unter diesen Bedingungen beträgt das Risiko der Beschädigung eines bestimmten Analyten ein Minimum. Andere Enzyme, die Haar unter neutralen oder sauren Bedingungen lösen sind: Protease Typ XIV (Pronase), Typ III (Prolase), Typ IV, Typ VIII, Typ XVI, Typ XVIII, Typ XIX, Typ XXIV, Typ XXVII (Nagarse), Typ XXVIII, Typ XXI und Typ XXIII.

Unter bestimmten Bedingungen ist es von Vorteil, das erfindungsgemäße Verfahren bei einem niedrigeren als dem üblichen pH-Wert durchzuführen, um die chemische Struktur des Analyten aufrechtzuerhalten oder um die Durchführung des Verfahrens zu vereinfachen. Wie vorstehend angegeben, tritt der Aufschluß des Haares bei einem pH-Wert zwischen ca. 8,3 und 10,5 auf, wenn ein Sulfhydryl-abhängiges Enzym (z.B. Papain) verwendet wird, und zwischen 7 und 9, wenn eine Protease (z.B. Proteinase K) verwendet wird. Bei irgendeinem pH-Wert in einem dieser Bereiche können verschiedene Analyten jedoch instabil werden oder zu einer verschiedenen Form hydrolysieren, was sowohl die Messung der Quantität als auch der Qualität des Analyten in der nachfolgenden Analysestufe beeinflussen könnte. Es wurde gefunden, daß bestimmte biologische Detergentien zur Lösung von Komponenten biologischer Membranen den Aufschluß des Haares bei einem relativ niedrigen pH-Wert unterstützen, ohne die enzymatische Aktivität oder die Antikörper-Antigen-Reaktion, die die



Empfindlichkeit des Immunoassays beeinflusst, zu stören. Dies ist überraschend und unerwartet, da festgestellt wurde, daß andere biologische Detergentien zur Verwendung in der Erfindung als ungeeignet gefunden wurden, weil sie zur

5 Unterstützung des Aufschlusses bei dem gewünschten niedrigen pH-Wert unwirksam sind, Proteinase K oder andere Haarprotein-aufschließende Enzyme deaktivieren und/oder die Bindung des Analyten durch den Antikörper stören oder beeinflussen, wodurch die Empfindlichkeit des Immunoassay drastisch

10 verringert wird. Siehe z.B. Higuchi, R. et al. „DNA Typing From Single Hairs“, Nature 332 (1988) 543-546.

Die biologischen Detergentien zusammen mit einem geeigneten Enzym (z.B. Protease und Sulfhydrylenzyme) und dem Aktivator

15 (z.B. DTT und DTE) sind zur Unterstützung des Aufschlusses der Haarprobe bei einem verringerten pH-Wert im Bereich von ca. 6,2 und 8 wirksam. Bestimmte der hier beschriebenen biologischen Detergentien sind erfindungsgemäß bei einem pH-Wert, der so niedrig wie ca. 5,8 ist, wirksam.

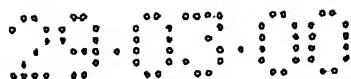
20

Die Proteaseenzyme (wie z.B. Proteinase K) sind für die Verwendung mit den hier beschriebenen biologischen Detergentien bevorzugt. Die biologischen Detergentien können auch wirksam zusammen mit den Sulfhydrylenzymen, z.B. Papain,

25 verwendet werden, um den Aufschluß der Haarprobe bei einem niedrigeren pH-Wert zu bewirken.

Die als erfindungsgemäß brauchbar gefundenen biologischen Detergentien umfassen die Gallensäuredetergentien, wie z.B.

30 Glykocholsäure, Cholsäure, Taurocholsäure, Deoxycholsäure, Glykodesoxycholsäure, Taurodesoxycholsäure und Salze davon, einschließlich von Natriumsalzen. Andere Detergentien, die zur erfindungsgemäßen Verwendung brauchbar sind, sind Sulfo-Betaine, wie z.B. die Zwittergentien^(R), und Betaine, wie



z.B. Empigen BB (Handelsname) (N-Dodecyl-N,N-dimethylglycin)
(alle von Calbiochem. Corp., La Jolla, CA) erhältlich.

Weitere Detergentien, die zur erfindungsgemäßen Unterstützung
5 des Aufschlusses von Haar bei relativ niedrigen pH-Werten
brauchbar sind, sind die Alkylglykoside, einschließlich
Hexyl-B-D-glycopyranosid, Heptyl-B-D-glycopyranosid, Octyl-B-
D-glucopyranosid, Nonyl-B-D-glucopyranosid, Decyl-B-D-
10 glucopyranosid, Dodecyl-B-D-maltosid und Octyl-B-D-
thioglycopyranosid (OSGP). Mischungen von Alkylglucosiden,
wie z.B. das Produkt ELUGENT (Handelsname) (Calbiochem) sind
ebenfalls wirksam.

Besonders bevorzugt für die Verwendung in der vorliegenden
15 Erfindung sind die Gallensäuren Cholsäure und Glycocholsäure,
die den Aufschluß von Haar bei einem pH-Wert im Bereich von
ca. 6,3 bis 8 unterstützen. Die Deoxycholate, wie z.B.
Deoxycholsäure und Glycodeoxycholsäure, sind wirksam bei der
Unterstützung des Aufschlusses von Haar bei einem pH-Wert
20 oberhalb von ca. 7.

Von den von Calbiochem Corp., La Jolla, CA, hergestellten
Detergentien sind Zwittergent^(R) SB3-14 (CAS Registry Nr.
14933-09-6, N-Tetradecylsulfobetain oder 3-
25 (Dodecyldimethylammonio)propan-1-sulfonat) bevorzugt. Der
Aufschluß des Haares unter Verwendung von Zwittergent^(R)-
Sulfo-betain-Detergentien tritt typischerweise bei pH = 6,3
bei 37 °C auf. Zwittergents^(R) sind eine Klasse von
Detergentien, die als Sulfo-betaine mit der allgemeinen
30 Struktur bekannt sind:

29.03.00

worin x irgendeine Zahl sein kann, die ein wirksames biologisches Detergens ergibt. Bevorzugt sind solche Verbindungen, worin x im Bereich von 7 bis 16 liegt. Besonders bevorzugt ist ein Detergens mit $x = 14$. Andere erfindungsgemäß brauchbare Zwittergent^(R)-Sulfo-betain-Detergentien sind:

10 1. Zwittergent^(R) SB3-08 worin $x = 7$ [N-Octylsulfobetain oder 3-(Octyldimethylammonio)propan-1-sulfonat] [CAS Registry Nr. 15178-76-4].

15 2. Zwittergent^(R) SB3-10 worin $x = 9$ [N-D-Dodecylsulfobetain oder 3-(Dodecyldimethylammonio)propan-1-sulfonat] [CAS Registry No. 15163-36-7].

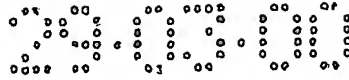
20 3. Zwittergent^(R) SB3-12 worin $x = 11$ [N-Dodecylsulfobetain oder 3-(Dodecyldimethylammonio)propan-1-sulfonat] [CAS Registry No. 14933-09-6].

25 4. Zwittergent^(R) SB3-14 worin $x = 13$ [N-Tetracylsulfobetain oder 3-(Dodecyldimethylammonio)propan-1-sulfonat] [CAS Registry No. 14933-09-6].

5. Zwittergent^(R) SB3-16 worin $x = 15$ [N-Hexadecylsulfobetain oder 3-(Hexadecyldimethylammonio)propan-1-sulfonat] [CAS Registry No. 2281-11-0].

30 Für Screeningassays auf die Einnahme von Marihuana sind Cholat- und Deoxycholat-Detergentien bevorzugt.

Bei der praktischen Durchführung wird das biologische Detergens mit der wässrigen Lösung des Aktivators, wie z.B.



DTT (oder DTE) und dem Enzym (vorzugsweise Proteinase K) vor dem in-Kontakt-Bringen der Lösung mit der Haarprobe in einem bevorzugten Temperaturbereich von ca. 30 bis 40 °C, wie hier beschrieben, gemischt. Typischerweise werden ca. 1 bis 2 mg
5 des biologischen Detergens zur ca. 1 ml Aufschlußlösung zugegeben.

Erfindungsgemäß wird ein Ionenaustauschharz verwendet, um von der Haaraufschlußlösung eine Substanz zu entfernen, die mit
10 dem Marihuanaassay eine störende Reaktion ergibt. Diese Störung trat mit allen zur Zeit verfügbaren kommerziellen RIA-Kits auf, die zur Bestimmung von Cannabinoiden geeignet sind. Die störende Substanz ist in jeder Haarprobe in von Individuum zu Individuum wechselnden Mengen vorhanden, und es
15 wird angenommen, daß sie im Haar auf natürliche Weise vorkommt und scheint den Assay als Ergebnis einer Kreuzreaktion mit dem Marihuana-RIA-Antikörper (d.h. den auf Cannabinoiden spezifischen) zu stören, und weniger durch Matrixwirkungen. Dies ist wahrscheinlich deshalb der Fall,
20 weil die Verdünnung der störenden Substanz eine asymptotische Kurve bildet, die in der Form identisch mit der Form der Eichkurve erscheint, die mit dem Carboxytetrahydro-Cannabinol („Carboxy-THC“)-Standard, der für einen RIA-Marihuana-Assay verwendet wird, scheint, und nicht eine S-geformte
25 Verdünnungskurve, die zu erwarten ist, wenn Matrixeffekte die Ursache der Störung wären. Es scheint, daß diese störende Substanz eine Lipidsubstanz ist und eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu Carboxy-THC besitzt.

30 Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Carboxy-THC und anderen Cannabinoiden, wie z.B. Tetrahydrocannabinol („THC“) ergibt die störende Substanz falsch-positive Ergebnisse in Assays an Haaraufschlüssen unter Verwendung von RIA zur Bestimmung der Aufnahme von Marihuana. Mit anderen Worten wird RIA
35 irrtümlicherweise die störende Substanz als ein Cannabinoid



der Aufnahme von Marihuana identifizieren, sogar dann, wenn Individuen kein Marihuana aufgenommen haben. Es ist deshalb notwendig, bei der Durchführung eines RIA-Assays zur Bestimmung der Einnahme von Marihuana die störende Substanz von der Aufschlußlösung zu entfernen, bevor die Lösung der Immunoassayanalyse unterworfen wird.

Da das Vorhandensein dieser störenden Substanz im Haar eine neue Entdeckung ist, gibt es im Stand der Technik keine bekannte Methode um sie zu entfernen. Die Entfernung der störenden Substanz aus der Aufschlußlösung ist außerdem durch die Ähnlichkeit mit Lipid-Carboxy-THC und THC kompliziert, die üblichsten diagnostischen Analyten in einem Marihuanaassay. Viele Filtrationsverfahren mit der Fähigkeit, unerwünschte Substanzen abzufiltrieren, sind zur Entfernung der störenden Substanz aus der Aufschlußlösung nicht wirksam, weil sie entweder die störende Substanz nicht wirksam entfernen und/oder weil sie die Analyten entfernen, z.B. THC und Carboxy-THC.

Es war deshalb überraschend, daß im Haar ein Analyt existiert, der eine Marihuana-Einnahme anzeigt, und der nicht viele der lipiden Eigenschaften der störenden kreuzreagierenden Substanz besitzt, und trotzdem mit dem im RIA-Assay auf Marihuana verwendeten Cannabinoid-Antikörper reagiert. Die exakte chemische Struktur dieser immunoreaktiven Substanz (Substanzen), oder des modifizierten Lipid-Marihuana-Analyten ist nicht bekannt. Seine Gegenwart in der Haarprobe bestätigt jedoch die Einnahme von Marihuana.

Überraschend ist auch die Feststellung, daß die störende Substanz aus der Aufschlußlösung entfernt werden kann, ohne den neu entdeckten modifizierten lipidschen Marihuana-Analyt unter Verwendung bestimmter im Handel erhältlicher Ionenaustauscher zu entfernen. Es wurde gefunden, daß

29.03.00

Suspensionen bestimmter Ionenaustauschharze beim Kontakt mit der Aufschlußlösung die störende Substanz zusammen mit bestimmten Cannabinoiden, wie z.B. THC, aus der Aufschlußlösung entfernen, aber in der Aufschlußlösung andere
5 diagnostische Cannabinoide, wie z.B. den modifizierten Lipiden Marihuana-Analyt, zurücklassen, der dann durch im Handel erhältliche RIA-Kits unter Verwendung eines Cannabinoid-Antikörpers bestimmt werden kann. Die Verwendung dieser Ionenaustauschharze zur Entfernung der störenden
10 Substanz, wodurch die Bestimmung der modifizierten lipidischen Marihuana-Analyten im RIA-Assay ohne Störung möglich ist, ist es sowohl zweckmäßig und kosteneffektiv.

Wirksame Ionenaustauschharze sind sowohl anionische als auch
15 kationische. Sie sind im allgemeinen handelsüblich erhältlich, wie z.B. von Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri. Es wurde jedoch gefunden, daß sie nicht in der Form am wirksamsten sind, in der sie im Handel erhältlich sind (im allgemeinen als grobe, sich rasch absetzende Teilchen), oder
20 auf die Weise, in der sie allgemein verwendet werden (z.B. als gepackte Säulen), sondern wenn sie in Kontakt mit der Aufschlußlösung in Form einer Suspension stehen, z.B. wenn sie durch heftiges Rühren in kleinere sich langsam absetzende Teilchen zerbrochen werden und aus diesen kleinen Teilchen
25 eine feine Suspension hergestellt wird. Wirksame Ionenaustauschharze umfassen:

1. Anionenaustauscher an Dextrose, wie z.B. DEAE-Sephadex (Handelsname) (A-25 und A-50-Diethylaminoethyl Sephadex) und
30 QAE-Sephadex (Q-50 Diethyl-[2-hydroxypropyl]aminoethyl Sephadex);
2. Anionenaustauscher an Agarose, wie z.B. DEAE Sepharose CL-6B (Handelsname) (Diethylaminoethyl Sepharose) und Q Sepharose;
- 35 3. Anionenaustauscher an Cellulose, wie z.B. DEAE Sephacel

29.03.00

- (Handelsname) (Diethylaminoethyl Sephacel);
 Ecteola Cellulose (Epichlorhydrin Triethanolamin Cellulose);
 PEI Cellulose (Polyethylenimin Cellulose); QAE Cellulose
 (Diethyl-[2-hydroxypropyl]aminoethylcellulose); und DEAE-
 5 Cellulose;
 4. Kationenaustauscher an Dextran, wie z.B. SP-Sephadex C25
 (Sulfopropyl Sephadex)
 5. Stark saure Kationenaustauscher an Polystyrol, wie z.B:
 Amberlite 200 (Handelsname) (aktive Gruppe: Sulfonsäure,
 10 Natriumform); Dowex HCR-S (Handelsname) (aktive Gruppe: an
 Kerne gebundene Sulfonsäure, Wasserstoffform) und Dowex-
 makroporöses Harz (aktive Gruppe: kerngebundene Sulfonsäure,
 Wasserstoffform).
 6. Spezielle Austauscher, wie z.B. Benzyl-DEAE-Cellulose
 15 (Benzyl-diethylaminoethylcellulose) und TEAE-Cellulose
 (Triethylaminocellulose).

Die Konzentration an Harz wird abhängig vom verwendeten Harz
 variieren. Die Konzentrationen können bis zu ca. 50 %
 20 (Gew/Vol) variieren. Eine Suspension aus DEAE Sephadex A25 in
 deionisiertem Wasser wird z.B. vorzugsweise hergestellt unter
 Verwendung von ca. 3 bis 9 g Harz/100 ml Wassr. Die
 Suspension wird quellen gelassen. Es wurde gefunden, daß ein
 mindestens einstündiges Quellenlassen bei Raumtemperatur
 25 ausreicht. Nach dem Quellen wird die Suspension mindestens 30
 Minuten und vorzugsweise bis zu ca. 60 Minuten gerührt oder
 heftig geschüttelt, bis eine feine Suspension erhalten wird.
 Vorzugsweise besitzt die Suspension eine Absetzzeit im
 Bereich von 50 bis 60 Minuten, im Vergleich mit ca. 10 bis 15
 30 Minuten für eine wässrige Suspension eines nicht
 geschüttelten Harzes. Ein heftiges Rühren oder irgendeine
 andere Methode, die zu einem Aufbrechen des Harzes in kleine
 Teilchen führt, ergibt die besten Ergebnisse bei der
 Entfernung der störenden Substanz aus der Aufschlußlösung.

29.03.00

- Um die Entfernung der störenden Substanz zu erzielen, werden ca. gleiche Teile der Haaraufschlußlösung und der feinen Suspension miteinander gemischt. Das Verhältnis von Suspension zu Haaraufschlußlösung hängt jedoch vom
- 5 verwendeten Harz und seiner Konzentration in der Haarsuspension ab. Im allgemeinen beträgt das Verhältnis der Aufschlußlösung zur Suspension 4 bis 3, wenn eine Suspension von 3 bis 9 % (im Gewicht/Volumen) verwendet wird. Die Mischung wird so gerührt, daß die Suspension und die
- 10 Aufschlußlösung in direktem Kontakt miteinander sind. Dann wird destilliertes Wasser zugefügt und die Mischung zentrifugiert, und eine Probe des Überstands von der harzhältigen Aufschlußlösung erfindungsgemäß geprüft.
- 15 Obgleich das erfindungsgemäße Verfahren zur Entfernung der störenden Substanz im Zusammenhang mit einer Aufschlußlösung beschrieben wurde, ist es einzusehen, daß die Ionenaustauschharz-Suspension bei irgendeinem Haaranalyseverfahren verwendet werden kann, bei dem die
- 20 Entfernung der störenden Substanz wünschenswert oder notwendig ist, vorausgesetzt, daß die Analyten in einer wässerigen Albuminlösung nahe dem neutralen pH-Wert, wie er für den RIA-Assay erforderlich ist, enthalten sind. Die Harzsuspensionen können z.B. zusammen mit bekannten
- 25 Haarextraktions (Säure, Base oder Lösungsmittel)-Verfahren oder irgendeinem anderen Verfahren verwendet werden, das eine Haarprobe zerstört, und eine Freisetzung von mindestens einem Teil des Inhalts der Haarprobe in eine Lösung ergibt, die die störende Substanz enthält.
- 30 Im Gegensatz zu anderen verfügbaren Analyt-Bestimmungsmethoden, wie z.B. Urin- und Blutanalysen, erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Bestimmung der Einnahme eines Analyten während eines bestimmten Zeitraums, und ist
- 35 deshalb sehr zweckmäßig zur Bestimmung von chronischem

29.03.00

- Drogenmißbrauch. Da Haar dafür bekannt ist, daß es mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,3 bis 0,4 mm/Tag oder ca. 1,0 bis 1,3 cm/Monat wächst, ist es möglich, den Verbrauch oder die Einnahme so weit zurückzuverfolgen, wie es die Haarlänge erlaubt, indem man Haarschnitzel verschiedener Länge auswertet, und die Verwendung hochempfindlicher Immunoassays erlaubt die Analyse kleiner in den kleinen Haarschnitzeln enthaltener Analytproben.
- 10 Durch abschnittsweise Analyse stellt das erfindungsgemäße Verfahren eine relativ permanente Aufzeichnung und einen Hinweis für ein Drogenaufnahmeverhalten dar, oder für die vorausgehende Einnahme anderer Substanzen während Zeiträumen, die von mehreren Tagen bis zu Monaten oder sogar Jahren nach der letzten Einnahme reichen. Die Vorgeschichte einer solchen Einnahme kann so detailliert wie gewünscht durchgeführt werden, indem man geeignet kurze Abschnitte des Haares analysiert, das die verschiedenen Wachstumsperioden repräsentieren. Auf diese Weise kann eine frühere Einnahme während einer Periode und das Ausmaß einer solchen Einnahme, bestimmt werden.
- Obwohl die Verwendung von Kopfhaar zur erfindungsgemäßen Verwendung aufgrund seiner Länge und Zugänglichkeit bevorzugt ist, ist es möglich, auch irgendein anderes Körperhaar im erfindungsgemäßen Verfahren zu verwenden. Es ist deshalb praktisch nicht möglich einen Test nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zu vermeiden, indem man sich den Kopf abrasiert.
- 30 Behandlungen, wie z.B. Dauerwellen und Färben, kann die Geschwindigkeit der Auflösung des Haares, das dem erfindungsgemäßen Verfahren unterworfen wird, jedoch erhöhen. In einigen Fällen kann aufgrund solcher Behandlungen etwas Analyt verlorengehen, bevor das Verfahren durchgeführt wird.
- 35 Wenn das zu behandelnde Haar so gealtert ist, ist ein

29.03.00

Ansteigen in der Aufschlußgeschwindigkeit vorhanden und ein geeigneter Korrekturfaktor kann, auf der Basis bekannter Geschwindigkeiten zum Aufschluß vom normalen Haar, angewendet werden.

5

Bestimmte andere kosmetische Mittel, wie z.B. bestimmte Relaxiermittel, können verursachen, das ein Haar gegenüber einem Aufschluß beständig wird. Eine solche Beständigkeit kann überwunden werden, indem man die Menge an verwendetem

10 Enzym erhöht. Vorzugsweise wird Proteinase K als Enzym verwendet, wenn eine solche Beständigkeit gegenüber Aufschluß festgestellt wird.

Die durch Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zu
15 erhaltenden Vorteile sind vielfach. Das Verfahren stellt eine rasche und genaue Diagnose für eine frühere Einnahme eines bestimmten Analyten dar. Das Haar- und keratinisierte Struktur-Analysenverfahren kann einen Bericht über den Verbrauch oder Nichtverbrauch während sehr langer Zeiträume
20 bereitstellen. Vermutungen über die Bedeutung einer Blut- oder Urinanalyse sind überflüssig. Das Einsammeln von Haar ist weniger aufdringlich und physikalisch weniger widerwärtig als das Einsammeln von Blut oder Urin, und die Proben können nicht verändert oder ersetzt werden, und außerdem kann die
25 Bestimmung durch kurzzeitige Abstinenz oder „Spülung“ (übermäßige Flüssigkeitseinnahme) vor dem festgesetzten Test, z.B. einem Einstellungstest oder einer jährlichen physischen Überprüfung, umgangen werden. Die Proben können ohne Einfrieren auf unbestimmte Zeit gelagert werden.

30

Die erfindungsgemäßen Verfahren, die zum Aufschluß von Haar geeignet sind, können auch verwendet werden, um die Anwesenheit und Struktur natürlich auftretender Komponenten des Haares, wie z.B. von DNA, zu bestimmen.

35

29.03.00

Die nachstehenden Beispiele veranschaulichen bestimmte
erfindungsgemäße Aspekte, ohne die Erfindung, wie sie in der
Beschreibung und in den Ansprüchen angegeben ist, zu
5 beschränken.

Beispiel 1

Aufschluß von Haar unter Verwendung von Proteinase K und
10 Entfernung der störenden Substanz bei einem Marihuana-Assay

10 mg Haar aus einem bekannten normalen Menschen (der kein
Marihuana einnimmt) und 10 mg eines Haares aus einem
bekannten Menschen, der Marihuana einnimmt, wurden in
15 getrennte 13 x 75 mm Polycarbonat-Röhrchen gegeben. In jedem
der Röhrchen wurde 1 ml der folgenden Lösung zum Haar
zugegeben: 0,5 M Tris Puffer (pH = 6,5, bei Raumtemperatur),
der 1 ml 2 E Proteinase K, 2 mg Cholsäure (Natriumsalz) und
60 mg Dithiothreitol enthielt. Die Mischungen wurden 16
20 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Nach 16 Stunden wurden die
Proben bei 3000 UpM 20 Minuten lang zentrifugiert. Zu 0,9 ml
des nach dem Zentrifugieren entfernten Überstandes wurden 10
µl Phenylmethylsulfonylfluorid (6 % in Ethanol) gegeben. Es
wurde gemischt, und dann 90 µl CuSO₄·5H₂O (10 g/l) zugegeben.
25 Die Mischungen wurden bei 37 °C 30 Minuten lang geschüttelt.

6 g von trockenem A-25-120 DEAE Sephadex, erhältlich von
Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, wurden zu 100 ml
destilliertem deionisiertem Wasser gegeben. Die Suspension
30 wurde über Nacht in einem Kühlschrank (2 bis 8 °C) quellen
gelassen. Nach dem Quellen wurde die Suspension in ein
Becherglas mit einem großen Magnetührstab gegeben, und auf
einer Magnetührplatte 60 Minuten heftig gerührt, bis das
Harz in kleine Teilchen zerbrochen war, wodurch eine sehr
35 feine Suspension erhalten wurde.

29.03.00

Zu 400 µl jeder der Haaraufschlußlösungen wurden 300 µl 6 %-ige Harzsuspension in einem Glasröhrchen zugegeben. Die Glasröhrchen wurden während 30 Minuten auf solche Weise
5 heftig gerührt (mit mehr als 200 Umdrehungen/Minute), um das Harz suspendiert und in Kontakt mit der Aufschlußlösung zu halten. Zu jedem der Röhrchen wurden 0,7 ml destilliertes Wasser zugegeben. Die Röhrchen wurden dann zentrifugiert, und 1,0 ml des Überstandes aus der harzhaltigen Aufschlußlösung
10 entfernt. 200 µl 1M Phosphatpuffer wurden dann zu jeder Lösung zugegeben. 100 µl des Filtrats jeder Probe wurden dann mittels RIA auf Marihuana geprüft. Die Ergebnisse waren die folgenden:

- 15 Probe 1 (bekannt negativ) 4597 cpm
Probe 2 (bekannt positiv) 2683 cpm

Im Vergleich zu den Negativproben (100 %) zeigte Probe 2 ein B/B₀ von 59 %, was ein positives Ergebnis für das
20 Vorhandensein eines Marihuana-Analyts in der Probe 2 ist.

Beispiel 2

Bekannt-negative Haarproben wurden mit bekannt-positiven
25 Haarproben unter Verwendung eines Ionenaustauscherharzes verglichen.

8 negative Haarproben, von denen es bekannt war, daß sie eine große Variabilität in der Bindung im Marihuana-Assay aufgrund
30 wechselnder Mengen an störender kreuzreagierender Substanz zeigten, und eine Haarprobe von einem bekannten Marihuana-Anwender wurden aufgeschlossen und nach dem im Beispiel 1 beschriebenen Verfahren neutralisiert. Die Aufschlüsse wurden mit wässrigen Suspensionen verschiedener Harze, die in den
35 nachstehend angegebenen Konzentrationen (als Prozent in

29.03.00

Flaschen gefülltes Harz bezogen auf die Gesamtsuspension) behandelt, und die harzenthaltenden Aufschlußlösungen im RIA-Test getestet.

- 5 Detaillierter angegeben wurden 0,4 ml der Aufschlußlösung mit 0,3 ml der Harzsuspension in einem 13 x 100 mm Glasröhrchen gemischt, und die Röhrchen bei >200 UpM 30 Minuten lang geschüttelt. Dann wurden 0,75 ml destilliertes Wasser zu jedem Röhrchen zugegeben und die Röhrchen gut gemischt und
10 bei 200 UpM während 10 Minuten zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde aus jedem Röhrchen entfernt und in ein 13 x 100 mm Glasröhrchen gegeben.

- Bei der Durchführung des Marihuana-Assays wurden zum Röhrchen
15 200 µl 1 M Phosphatpuffer (pH = 7) zugegeben, und dann 100 µl I^{125} Marihuana-Tracer und 100 µl Anti-Cannabinoid-Antikörper. Die Röhrchen wurden gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl eines zweiten ausfällenden Antikörpers wurden zugegeben und danach 1 ml 6 %
20 Polyethylenglykol. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Röhrchen bei 3000 UpM in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren wurden die Röhrchen in einem Gamma-Spektrometer gezählt.

- 25 Der Mittelwert und die Standardabweichungen der Zählungen der Negativen wurden berechnet, um die Wirksamkeit des Harzes bei der Entfernung der störenden kreuzreagierenden Substanz zu bestimmen. Zur Bestimmung, wie gut der Analyt nicht entfernt wurde, wurden die Zählungen des positiven
30 Haarprobenaufschlusses, geteilt durch den Mittelwert der Negativen, berechnet.

Unter Verwendung einer 2,4 %-igen Harzsuspension von DEAE-Sephadex (A-50-120) wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

29.03.00

MEISSNER, BOLTE & PARTNER

M/BWT-062-EP/DE

33

	Probe	CPM
	Negativ #1	3961
	Negativ #2	4391
5	Negativ #3	3712
	Negativ #4	3804
	Negativ #5	3574
	Negativ #6	4004
	Negativ #7	4010
10	Negativ #8	4252
	Positiv #1	2489
	Positiv #2	2424

Der Mittelwert der negativen Proben betrug 3964, mit einer
 15 Standardabweichung von 238 (6 % des Mittelwertes). Das
 Verhältnis B/B_0 der positiven Proben beträgt 62 %. Der
 Rauschabstand zeigt deshalb an, daß der Assay empfindlich
 ist.

20 Für DEAE-Sephrose (CL-6B) wurden unter Verwendung einer 24
 %-igen Harzsuspension die folgenden Ergebnisse erhalten:

	Probe	CPM
25	Negativ #1	4085
	Negativ #2	4070
	Negativ #3	3661
	Negativ #4	3771
	Negativ #5	3555
30	Negativ #6	3677
	Negativ #7	3806
	Negativ #8	4137
	Positiv #1	2550
	Positiv #2	2539

35

29.03.00

MEISSNER, BOLTE & PARTNER

M/BWT-062-EP/DE

34

Der Mittelwert der negativen Proben betrug 3845, mit einer Standardabweichung von 196 (5 % des Mittelwertes). Das Verhältnis B/B_0 beträgt 66 %. Der Rauschabstand zeigt deshalb auch hier wieder an, daß der Assay empfindlich ist.

5

Obwohl hier die Ausführungen beschrieben wurden, die als die zur Zeit bevorzugten Ausführungsformen angenommen werden, ist es für einen Fachmann auf diesem Gebiet ersichtlich, daß zahlreiche Abänderungen in den Bestandteilen, Bedingungen und

10 Anteilen, die in den vorstehenden Ausführungsformen angegeben wurden, durchgeführt werden können, ohne sich vom Rahmen der vorliegenden Erfindung, wie sie hier beschrieben und in den anliegenden Ansprüchen definiert wird, zu entfernen.

0 6 3 4 0 1 4

29.03.00

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Einnahme von Marihuana durch ein Individuum, umfassend:
 - (a) chemisches Behandeln einer Haarprobe des Individuums auf eine Weise, durch die ein Analyt freigesetzt wird, der aus dem Blutstrom des Individuums als Ergebnis der Marihuana-Aufnahme im Haar eingelagert wurde, um eine Testlösung herzustellen, wobei diese Lösung eine störende kreuzreagierende Lipidsubstanz enthält, die üblicherweise im Haar aufgefunden wird;
 - (b) Herstellen einer Suspension eines Ionenaustauscherharzes in einer Konzentration und Menge, die ausreicht, um die störende Substanz aus der Testlösung zu entfernen, damit der Analyt durch einen Immunoassay unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an Cannabinoide bindet, bestimmt werden kann;
 - (c) Mischen der Testlösung und der Suspension, um die störende Substanz aus der Testlösung zu entfernen; und
 - (d) nachdem die störende Substanz im wesentlichen aus der Testlösung entfernt wurde, Analysieren eines Teils der Lösung mittels eines Immunoassays unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an Cannabinoide bindet, um den Analyt, wenn er vorhanden ist, nachzuweisen.
2. Verfahren zum Nachweis der Einnahme von Marihuana durch ein Individuum umfassend:
 - (a) chemisches Behandeln einer Haarprobe des Individuums auf eine Weise, die einen Analyt freisetzt, der aus dem Blutstrom des Individuums als Ergebnis der Marihuana-Aufnahme im Haar eingelagert wurde, um eine Testlösung

29.03.00

2

herzustellen, wobei diese Lösung eine störende kreuzreagierende Lipidsubstanz enthält, die üblicherweise im Haar aufgefunden wird;

- 5 (b) Herstellen einer Suspension von sich langsam absetzenden Teilchen von Ionenaustauscherharzen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Anionenaustauschern an Dextrose; Anionenaustauschern an Agarose; Anionenaustauschern an Cellulose; Kationenaustauschern an Dextran; stark sauren Kationenaustauschern an Polystyrol; 10 Benzyldiethylaminoethylaustauschern an Cellulose; und Triethylaminocelluloseaustauschern in einer Menge und Konzentration, die ausreicht, um die störende Substanz aus der Testlösung zu entfernen, damit der Analyt durch einen Immunoassay unter Verwendung eines Antikörpers, der 15 spezifisch an Cannabinoide bindet, bestimmt werden kann;
- (c) Mischen der Testlösung und der Suspension, um die störende Substanz aus der Testlösung zu entfernen; und danach
- (d) direktes Analysieren eines Teils der Testlösung 20 mittels eines Immunoassays unter Verwendung eines Antikörpers, der spezifisch an Cannabinoide bindet, um die Gegenwart des Analyten nachzuweisen.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch 25 gekennzeichnet, daß die chemische Behandlung von Haar zur Ausbildung der Testlösung das Herstellen einer Mischung umfaßt aus
- (i) einem Mittel ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Dithiothreitol und Dithioerythrit,
- 30 (ii) Proteinase K und
- (iii) einer Haarprobe;
- wobei die Menge der Proteinase K und des Mittels eine solche ist, die ausreicht, um den Aufschluß der Haarprobe zu bewirken.

35

29.05.00

3

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Haarprobe bei einem pH-Wert zwischen 7 und 9 bei einer Temperatur zwischen ca. 20 und 40 °C aufgeschlossen wird.